

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007 年度 ～ 2008 年度
 課題番号：19390420
 研究課題名（和文） 制限増殖型ウイルス治療における PET を用いた新規評価法の開発
 研究課題名（英文） The assessment using Positron Emission Tomography in conditionally replicating adenovirus therapy.

研究代表者

後藤 章暢 (GOTOH AKINOBU)
 兵庫医科大学・医学部・教授
 研究者番号：70283885

研究成果の概要（和文）：

新規制限増殖型アデノウイルスベクター(Ad-CMVsr39TK-OCE1a)を作製し、Positron Emission Tomography (PET) を用いてマウス前立腺癌モデルに対する遺伝子治療の治療効果ならびに遺伝子導入効率を評価した。 [¹⁸F]FDG を用いた PET 撮影は、遺伝子治療における抗腫瘍効果の画像評価として有用であり、また [¹⁸F]FHBG を用いた PET 撮影は、遺伝子導入効率の評価法として有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we demonstrated the possibility of assessment using Positron Emission Tomography for prostate cancer model received conditionally replicating adenovirus therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：細胞・遺伝子治療

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌、遺伝子治療、PET、

1. 研究開始当初の背景

近年、癌に対する遺伝子治療臨床研究の領域において、欧米を中心としてアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の開発が進んでおり、中でも増殖型アデノウイルスベクターは今後臨床研究の主流となりつつある。これまでは癌細胞周囲の正常細胞へのアデノウイルス感染による危険性が危惧され、非増殖型アデノウイルスベクターを用いた

基礎及び臨床研究が盛んに行われていたが、非増殖型であるがゆえに標的となる腫瘍全体へのウイルスベクターの暴露が制限され、臨床的な抗腫瘍効果が十分には期待出来ないという問題を抱えていた。また安全性の面から、癌に対する遺伝子治療においては、対象とする遺伝子を癌細胞に特異的に効率良く発現させるために、癌細胞で特異的に活性化される腫瘍特異性プロモーターを用いた

癌遺伝子治療法の基礎研究、および臨床試験が盛んにおこなわれている。中でも、特に腫瘍特異性プロモーターと自殺遺伝子を組み合わせた治療法が注目を集めており、研究代表者である後藤章暢らはこの治療戦略を用いて、神戸大学附属病院において 2003 年 8 月から 2006 年 3 月にかけて内分泌療法抵抗性前立腺癌の骨転移、リンパ節転移および局所再発例に対する自殺遺伝子治療として、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (Herpes Simplex Virus-Thymidine Kinase、以下: HSV-TK) 遺伝子を、腫瘍特異性オステオカルシン (Osteocalcin、以下: OC) プロモーターにより制御発現させる非増殖型アデノウイルスベクター (以下: Ad-OC-TK) を単独で前立腺癌骨転移巣または局所再発巣に局所内投与し、その後バラシクロビル (Valacyclovir: VAL) を経口投与するという第 I/II 相遺伝子治療臨床研究を施行した。これまでの前立腺癌に対する遺伝子治療臨床研究における評価法は PSA の推移が主に利用されていたが、治療効果の評価が不十分であるため、より臨床症状に合致した革新的な評価法の開発として PET (Positron Emission Tomography) を用いた評価法の開発に携わってきた。

PET は、陽電子放出核種にて標識した薬物を生体に投与し、放射能の分布やその経時的な変化を PET カメラにて撮像することにより、機能的な画像を得る診断法である。その特徴として非侵襲的に生化学、生理学的情報が得られること、2 本の γ 線を計測することによって高い分解能と定量性に優れる事が挙げられる。我々はこれまでに、マウス前立腺癌皮下腫瘍モデルおよび骨転移モデルに対する腫瘍特異性オステオカルシンプロモーターを組み込んだ非増殖型アデノウイルスベクター (Ad-OC-TK) および VAL を用いた遺伝子治療を行い、同時にフッ素 18 で標識したグアニン誘導体 ([¹⁸F]FHBG) を用いた PET を施行することによる、遺伝子治療における Ad-OC-TK の導入効率の評価を行い、さらに、フッ素 18 標識フルオロデオキシグルコース ([¹⁸F]FDG) を用いて経時的な遺伝子治療効果の判定法の開発を行ってきた。これまでに、HSV-TK の発現部位に一致して [¹⁸F]FHBG が集積することを利用して Ad-OC-TK の導入効率を検討した結果、マウス前立腺癌皮下腫瘍および骨転移モデルともに腫瘍部位における [¹⁸F]FHBG の集積が認められた。また、遺伝子治療効果の判定では、非治療群と比較して治療群での [¹⁸F]FDG の集積が極めて低いことが確認でき、導入効率の検討結果とあわせて、PET によるベクター投与部位における遺伝子治療効果判定の有用性を確認した。

この数年来、遺伝子治療の有効性を高めるためにより強力なベクター開発が盛んに行

われている。最近では癌細胞に増殖型のアデノウイルスベクターを感染させると、宿主である癌細胞内でウイルスが増殖し、やがて腫瘍細胞を崩壊させ、さらに、崩壊した腫瘍細胞に隣接する癌細胞へ感染を拡大し、やがて腫瘍全体にアデノウイルスベクターによる感染が拡大し、非増殖型アデノウイルスベクターと比較して、さらなる抗腫瘍効果が期待できるようになってきた。また OC プロモーターのような腫瘍特異性プロモーターでウイルスの複製に必須な初期遺伝子 (E1A 遺伝子) の発現を制御した制限増殖型のウイルスベクターを用いることにより、標的癌細胞でのみ増殖可能な遺伝子治療が可能となる。我々はこれまでにマウス前立腺癌モデルに対して腫瘍特異性 OC プロモーターを組み込んだ制限増殖型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療を行い、その抗腫瘍効果を確認してきた。このような制限増殖型アデノウイルスベクターを用いた癌に対する治療戦略は、近年欧米で臨床試験に応用されはじめており、前立腺癌に対する抗腫瘍効果に関する報告も見られる。しかしながら、現在の診断技術では、摘出不可能な臨床検体における増殖型アデノウイルスベクター投与後の腫瘍内での感染拡大様式や治療効果の正確な判定を行うことは非常に困難である。さらに、腫瘍特異性プロモーターなどを用いた制限増殖型アデノウイルスベクターを用いても、標的癌細胞以外の正常細胞にわずかながらの感染が存在した場合、ウイルスの増殖のため細胞障害が広がる可能性が危惧されるため、早期の発見は副作用を最小限に抑えるために重要である。

また、これまで我々が導入遺伝子として用いてきた TK 遺伝子は wild type であるが、近年の報告では wild type の TK 遺伝子導入と比較して、SR39mutant の TK 遺伝子を導入することで、前立腺癌細胞株に対する抗腫瘍効果が増大するという報告がなされている。さらに、SR39mutant の TK 遺伝子を用いることにより、wild type の TK 遺伝子導入と比較して、[¹⁸F]FHBG を用いた PET 施行による遺伝子導入効率を正確に判定でき、また、[¹⁸F]FHBG 投与による安全性については、ラットを用いた実験で、人への応用が可能であるという報告もみられる。

2. 研究の目的

細胞、遺伝子治療法が広く臨床応用されるためには、安全で簡便な治療効果を含めた有効性や副作用などの早期発見および治療ベクターの分布状況などの評価法や診断法の早急な確立が求められている。本研究においては、この手法の確立のためにマウスを用いた腫瘍特異性オステオカルシンプロモーターを組み込んだ制限増殖型アデノウイルス

ベクター (Ad-CMVsr39TK-OCE1a) およびアシクロビルを用いた遺伝子治療を行い、同時にHSV-TKMの発現部位に集積するフッ素18で標識したグアニン誘導体 ($[^{18}\text{F}]$ FHBG) を用いたPETを施行し、遺伝子治療における目的遺伝子の導入効率を検討する。さらに、フッ素18標識フルオロデオキシグルコース ($[^{18}\text{F}]$ FDG) を用いて経時的に治療効果の評価法を検討する。

3. 研究の方法

制限増殖型アデノウイルスベクター (AdOCE1a-TKM) の作製

これまでに我々が作製した AdOCE1a ベクターに存在する E3 欠損領域に HSV-TK (SR39mutant) 遺伝子を組み込むことで前立腺癌特異性 OC プロモーターにより制御発現させる制限増殖型アデノウイルスベクター (Ad-CMVsr39TK-OCE1a) を作製し、293細胞を用いてウイルスを増殖させた後、ウイルスベクターを精製する。また、精製後にヒト前立腺癌細胞株に対するウイルスベクターの複製能、HSV-TK (SR39mutant) 発現および細胞毒性を確認する。

マウス前立腺癌皮下腫瘍および骨転移モデルに対する遺伝子治療

Balb/C nu/nu マウスの背側皮下および大腿骨髄腔内にヒト前立腺癌細胞 PC-3 (1×10^6 個/腫瘍) を移植し、完成したマウス前立腺癌皮下腫瘍および骨転移モデルに対して、 2.5×10^9 plaque-forming unit (PFU) の Ad-CMVsr39TK-OCE1a を皮下腫瘍および骨転移巣内に注入する。

この注入は1日目、8日目の計2日間行うものとする。また、マウス腹腔内には10mg/kg/日のアシクロビルを1日目から21日目まで投与する。治療群として、非治療群 (PBS)、Ad-CMVsr39TK と ACV 治療群および Ad-CMVsr39TK-OCE1a と ACV 治療群の計3群とし、各群6匹のマウスを使用する。マウス前立腺癌皮下腫瘍モデルの観察期間は腫瘍径が 4000mm^3 に到達した時点とする。また、マウス前立腺癌骨転移モデルの観察期間は治療後4週間とする。

抗腫瘍効果の検討

(1) マウス前立腺癌皮下腫瘍モデルに対する遺伝子治療では、治療前1週間から3日おきに各群の腫瘍径を測定し、抗腫瘍効果を検討する。また、観察期間終了時点でマウスを先端医療センターでの動物実験規準に従い屠殺し、治療部位の病理組織学的検討を行う。

(2) マウス前立腺癌骨転移モデルに対する遺伝子治療では、治療開始から1週間おきにレントゲン撮影を行い、画像上の変化を観察し、抗腫瘍効果を検討する。

(3) マウス前立腺癌皮下腫瘍および骨転移モデルにおいて、非治療群 (PBS)、

Ad-CMVsr39TK と ACV 治療群および Ad-CMVsr39TK-OCE1a と ACV 治療群の計3群を対象とし、治療前、および治療開始後14日目、21日目、28日目にマウス尾静脈より 5.0MBq の $[^{18}\text{F}]$ FDG を投与し、投与1時間後にPETを施行する。癌の退縮に伴い糖代謝率の指標となる $[^{18}\text{F}]$ FDG の集積が低下することを利用し、遺伝子治療効果の評価を行う。

腫瘍内および主要臓器における HSV-TK 発現の検討

非治療群 (PBS)、Ad-CMVsr39TK と ACV 治療群および Ad-CMVsr39TK-OCE1a と ACV 治療群の計3群を対象とし、治療前、および治療開始後7日目、14日目、21日目、28日目のマウスに対して、 $[^{18}\text{F}]$ FHBG を用いたPETを施行し腫瘍内における HSV-TK の発現を経時的に観察することで、腫瘍内および主要臓器におけるウイルスベクターの経時的な広がりを検討する。

4. 研究成果

まず、本研究で使用する新規制限増殖型アデノウイルスベクター (Ad-CMVsr39TK-OCE1a) を作製し、ヒト前立腺癌細胞株における HSV-TK (SR39mutant) 発現を確認し、また細胞毒性を確認できた。次に、AdOCE1a-TKM を用いた動物実験を行った。まず、Balb/C スードマウスを用いてヒト前立腺癌細胞株である PC-3 の皮下腫瘍を形成した。腫瘍径が 5mm となった時点で、コントロール群では PBS を、治療群では 1.0×10^9 plaque-forming unit (PFU) の非増殖型アデノウイルスベクター (Ad-CMVsr39TK) および制限増殖型アデノウイルスベクター (Ad-CMVsr39TK-OCE1a) を治療1日目、8日目の計2回皮下腫瘍内に注入した。また、マウス腹腔内には10mg/kg/日のアシクロビルを1日目から21日目まで投与した。Ad-CMVsr39TK-OCE1a 群では、他の群と比較して有意に抗腫瘍効果を認めた。

最後に、マウス前立腺癌モデルに対する遺伝子治療の治療効果ならびに遺伝子導入効率を評価するために、フッ素18標識フルオロデオキシグルコース ($[^{18}\text{F}]$ FDG) をトレーサーとして用いた Positron Emission Tomography (PET) 撮影を施行し、コントロール群と遺伝子治療群について $[^{18}\text{F}]$ FDG の集積を比較し治療効果判定を行った。まず、Balb/C スードマウスを用いてヒト前立腺癌細胞株である PC-3 の皮下腫瘍を形成した。腫瘍径が 5mm となった時点で、コントロール群では PBS を、治療群では 1.0×10^9 plaque-forming unit (PFU) の非増殖型アデノウイルスベクター (Ad-CMVsr39TK) および制限増殖型アデノウイルスベクター (AdOCE1a-TKM) を治療1日目、8日目の計2回皮下腫瘍内に注入した。また、マウス腹腔内には10mg/kg/日のアシクロビルを1日目から

21 日目まで投与した。治療前、治療後 8、15、21 及び 28 日目に¹⁸F]FDG を尾静脈から投与し、経時的に PET 撮影を施行した。コントロール群は、腫瘍部位に一致して¹⁸F]FDG が高い集積を示したが治療群では、腫瘍部位への¹⁸F]FDG 集積が低く、その傾向は Ad-CMVsr39TK と比較して Ad-CMVsr39TK-OCE1a で顕著であった。一方、マウス前立腺癌モデルに対する遺伝子導入効率を評価するために、PC-3 皮下腫瘍モデルに PBS、Ad-CMVsr39TK および Ad-CMVsr39TK-OCE1a を治療 1 日目、8 日目の計 2 回皮下腫瘍内に注入し、治療後 1、4、10、16 及び 28 日目にブッ素 18 で標識したグアニン誘導体 (¹⁸F]FHBG) を用いた PET 撮影を施行することで、治療部位における HSV-sr39TK の発現を検討した。コントロール群と比較して治療群では、治療部位に¹⁸F]FHBG の高い集積を認め、その傾向は Ad-CMVsr39TK と比較して Ad-CMVsr39TK-OCE1a で顕著であった。さらに、Ad-CMVsr39TK-OCE1a 群では、時間経過に伴って¹⁸F]FHBG 集積部位の拡大を認めた。

以上から、¹⁸F]FDG を用いた PET 撮影は、遺伝子治療における抗腫瘍効果の画像評価として有用であり、また¹⁸F]FHBG を用いた PET 撮影は、遺伝子導入効率の評価法として有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Yamada K, Morishita N, Katsuda T, Kubo S, Gotoh A, Yamaji H. Adenovirus vector production using low-multiplicity infection of 293 cells. *Cytotechnology*, 査読有、59 巻、2009、153-60.
- ② Terao S, Gotoh A. and et al. (15 名中 15 番目) A pilot study of quality of life of patients with hormone-refractory prostate cancer after gene therapy. *Anticancer Res.* 査読有、29 巻、2009、1533-7.
- ③ Terao S, Acharya B, Suzuki T, Aoi T, Naoe M, Hamada K, Mizuguchi H, Gotoh A. Improved gene transfer into renal carcinoma cells using adenovirus vector containing RGD motif. *Anticancer Res.* 査読有、29 巻、2009、2997-3001.
- ④ Shirakawa, T., Terao, S., Gotoh, A. and et al. (18 名中 18 番目) Long-term outcome of phase I/II clinical trial of Ad-OC-TK/VAL gene therapy for hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Hum. Gene Ther.*、査読有、18 巻、2007、1225-1232.
- ⑤ 後藤章暢, 寺尾秀治, 白川利朗、前立腺癌

—基礎・臨床研究のアップデート—, 前立腺癌に対する遺伝子治療の現状と展望. *日本臨牀*、査読無、2007、65 巻(増刊 10)、517-521.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 寺尾秀治, Acharya B, 鈴木 透, 濱田雄行, 後藤章暢. ヒト膀胱癌細胞株に対する IAI. 3B プロモーターを組み込んだ制限増殖型アデノウイルスベクターの有用性の検討. 第 59 回日本泌尿器科学会中部総、2009. 10. 30、金沢.
- ② Terao S, Acharya B, Suzuki T, Gotoh A. Improved gene transfer into renal carcinoma cells using an adenovirus vector. The 19th Annual Meeting of the International Urological Conference of Taiwan 2009. 8. 29、Kaohsiung.
- ③ Terao, S., Shirakawa, T., Tanaka, K., Takenaka, A., Kamidono, S., Fujisawa, M. and Gotoh, A. Therapeutic efficacy of midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus vector for targeting the midkine-expressing human bladder cancer cells. American Urological Association 2008 Annual Meeting (AUA2008)、2008. 5. 20、Orlando. U. S. A.
- ④ 寺尾秀治, 白川利朗, 日向信行, 田中一志, 武中 篤, 藤澤正人, 後藤章暢、内分泌療法抵抗性前立腺癌骨転移巣及び局所再発巣に対する Ad-OC-TK/VAL 遺伝子治療の第 I / II 相臨床試験. 第 23 回前立腺シンポジウム、2007. 12. 9、東京.

[図書] (計 1 件)

- ① 後藤章暢. 第 2 部ゲノム医療の実践に向けて 第 5 章 遺伝子治療 A: (総論) 遺伝子治療—歴史と背景—, B: (各論 1) 前立腺がんの遺伝子治療. 高岡裕, 久野慎一, 大田美香, 清野進, 高井義美編, 井村裕夫監修. *実践ゲノムの最前線*. 六然社、2009、A : 260-4、B : 265-71.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 章暢 (GOTOH AKINOBU)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 70283885

(2) 研究分担者

寺尾 秀治 (TERAO SHUJI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 10457103
久保 秀司 (KUBO SHUJI) *2007 年度のみ
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 10441320

(3) 連携研究者

***2名共 2007年度は研究分担者**

千田 道雄 (SENDA MICHIO)

先端医療振興財団・先端医療センター・研
究所副所長

研究者番号：00216558

富永 英之 (TOMINAGA HIDEYUKI)

先端医療振興財団・先端医療センター・研
究員

研究者番号：00393348